

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 20120051302131

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Importin 13与Arx相互作用的研究

A study of interaction between importin13 and Arx

柯桂芬

指导教师姓名: 陶涛 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 5 月 4 日

论文答辩日期: 2008 年 6 月 14 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 李祺福 教授

评 阅 人: _____

2008 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

1、保密 () ,在 年解密后适用本授权书。

(请在以上相应括号内 打“√”)

导师签名: _____ 日期: _____ 年 _____ 月 _____ 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
1.前言.....	3
1.1 蛋白质入核机制的研究.....	3
1.1.1 大分子物质核质转运及的本过程.....	3
1.1.2 importin13 的结构与功能的介绍能.....	4
1.2 Arx 的研究进展.....	6
1.2.1 ARX基因和Arx蛋白.....	6
1.2.1.1 ARX 基因的发现.....	6
1.2.1.2 ARX 基因.....	6
1.2.1.3 ARX 基因的表达方式.....	7
1.2.1.4 Arx 蛋白结构.....	8
1.2.2 Arx 蛋白的生物学功能.....	9
1.2.2.1 ARX 在脑发育中的作用.....	9
1.2.2.2.1 ARX 在细胞增殖中的作用.....	10
1.2.2.2.2 ARX 在区域化中的作用.....	10
1.2.2.2.3 ARX 在正切方向神经迁移中的作用.....	11
1.2.2.2.4 ARX 在辐射迁移中的作用.....	11
1.2.2.1 ARX 在细胞分化中的作用.....	12
1.2.2.2 ARX 在胰腺发育中的作用.....	13
1.3 本课题研究的目的是和意义.....	15
2.材料和方法.....	16
2.1 实验材料.....	16
2.1.1 抗体列表.....	•16
2.1.2 细胞列表.....	16

2.1.3 药品和试剂列表.....	16
2.2 实验方法	17
2.2.1 酵母双杂交实验.....	17
2.2.1.1 醋酸锂法转化 DNA 入酵母.....	17
2.2.1.2 酵母样品收集.....	18
2.2.1.3 酵母培养基配制.....	18
2.2.1.4 酵母双杂交.....	19
2.2.1.4.1 SD 选择性培养基中 3-AT 浓度的确定:.....	19
2.2.1.4.2 酵母菌株贮存和复苏.....	19
2.2.1.4.3 酵母双杂交步骤.....	19
2.2.1.4.4 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)活性的检测.....	20
2.2.1.4.5 从酵母菌中提取质粒.....	21
2.2.2 质粒提取和转化.....	21
2.2.2.1 质粒试剂配制.....	21
2.2.2.2 SDS 碱裂解小量制备质粒法.....	22
2.2.2.3 大规模质粒 DNA 的提取.....	23
2.2.2.4 感受态细胞的制备.....	24
2.2.2.4 DNA 转化.....	25
2.2.3 质粒构建实验.....	25
2.2.3.1 诱饵质粒的构建.....	25
2.2.3.2 pGEX-4T-2-F-Arx和PET-28(a+)-F-Arx的构建.....	25
2.2.4 生化实验.....	26
2.2.4.1 Western Blot(免疫印迹分析).....	26
2.2.4.2 蛋白质的表达和纯化.....	28
2.2.4.2.1 目的蛋白的大量表达.....	29
2.3.2.2 Arx—GST蛋白的纯化.....	30
2.3.2.3 Beads的回收.....	30
2.3.2. 4 蛋白质浓度测定方法.....	30
2.2.5 抗体的制备.....	31

2.2.5. 1血清中ARX抗体的纯化.....	31
2.2.6 细胞相关实验.....	32
2.2.6. 1 细胞培养有关试剂的配制.....	32
2.2.6. 2 胞培养基本操作流程.....	33
2.2.6. 2.1 换液.....	33
2.2.6. 2.2 传代.....	33
2.2.6. 2.3 细胞计数.....	34
2.2.6. 2.4 接种细胞.....	34
2.2.6. 2.5 瞬时转染.....	34
2.2.6. 2.6 裂解细胞.....	35
2.2.7 GST-pull down.....	36
2.2.8 免疫共沉淀.....	36
3.试验结果.....	38
3.1 酵母双杂交.....	38
3.1.1 酵母双杂交分析.....	38
3.1.1.1 pGBKT7-BD-C-imp13 的构建.....	39
3.1.1.2 pGBKT7-C-imp13-AH109 的表达.....	39
3.1.1.3 生长曲线测定 pGBKT7-C-IPO13 的毒性.....	40
3.1.1.4 自激活测试.....	40
3.1.1.5 筛选人胚胎脑 cDNA 文库.....	41
3.2 体内体外实验进一步验证相互作用.....	45
3.2.1 免疫共沉淀验证相互作用.....	45
3.2.2 GST-PULL DOWN 进一步验证相互作用.....	46
3.3 ARX 抗体制备及纯化.....	47
3.3.1 构建获得重组质粒 pGEX4T2-F-Arx, pET28(a+)-F-ARX.....	47
3.3.1.1 F-Arx DNA 片段的扩增.....	47
3.3.1.2 构建获得重组质粒 pGEX4T2-F-Arx, pET28(a+)-F-ARX.....	48
3.3.1.3 表达和纯化 pGEX4T2-F-Arx, 表达 pET28(a+)-F-ARX.....	49

3.3.2 抗血清的纯化.....	51
4.讨论.....	53
参考文献.....	55
致谢.....	59
附件.....	60

厦门大学博士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	2
1.Introduction	3
1.1 Mechanism of protein nuclear import.....	3
1.1.1 Nucleocytoplasmic transport of macromolecules.....	3
1.1.2 The function and structure of importin13.....	4
1.2 Rresearch advance of Arx	6
1.2.1 ARX gene and Arx protein.....	6
1.2.1.1 the discovery of ARX gene.....	6
1.2.1.2 ARX gene	6
1.2.1.3The Expression of ARX gene.....	7
1.2.1.4 The structure of Arx protein.....	8
1.2.2 Biological Function of Arx protein.....	9
1.2.2.1The function of Arx in brain development	9
1.2.2.2.1 The function of Arx in cell proliferation	10
1.2.2.2.2 The function of Arx in regionalization	11
1.2.2.2.3 The function of Arx in tangent direction.....	11
1.2.2.2.4 The function of Arx in radiant migration.....	12
1.2.2.1 The function of Arx in cell differentiation.....	13
1.2.2.2 The function of Arx in pancreas development.....	14
1. 3 Purpose and significance	15
2. Materials and methods	16
2.1 Materials	16
2.1.1 The list of antibodies.....	•16

2.1.2 The list of cell.....	16
2.1.3 The list of chemical reagents.....	16
2.2 Methods.....	17
2.2.1 Yeast Two-Hybrid.....	17
2.2.1.1 Transform DNA to yeast used lithium acetate	17
2.2.1.2 Collection of yeast sample.....	18
2.2.1.3 Confection of yeast medium culture.....	18
2.2.1.4 Yeast Two-Hybrid.....	19
2.2.2 Transformation and extraction of the plasmids.....	22
2.2.3 Plasmid construction.....	25
2.2.4 Biochemical experiments.....	26
2.2.4.1 Western Blot	26
2.2.4.2 Expression and purification of protein.....	28
2.2.4.2.1 The max purification of protein.....	29
2.3.2.2 The purification of Arx—GST.....	29
2.3.2.3 the recovery of Beads.....	30
2.3.2. 4 Mensuration of protein concentration.....	30
2.2.5 The preparation of antibody.....	31
2.2.5. 1 Purification antibody from antiserum.....	31
2.2.6 Cell Biology experiments.....	32
2.2.6. 1 Cell culture reagents.....	32
2.2.6. 2 the protocol of cell culture.....	33
2.2.6. 2.1 Culture medium change.....	33
2.2.6. 2.2 subculturing.....	33
2.2.6. 2.3 Cell count.....	34
2.2.6. 2.4 Cell seed.....	34
2.2.6. 2.5 transient transfection.....	34
2.2.6. 2.6 Cell lysate.....	35
2.2.7 GST-pull down assays.....	36

2.2.8 co-immunoprecipitation.....	36
3. Results.....	38
3.1 Yeast Two-Hybrid.....	38
3. 1. 1Analysis of Yeast Two-Hybrid.....	38
3.1.1.1 Constructs of plasmid pGBKT7 -BD -C-imp13.....	39
3.1.1.2 Expression of pGBKT7-C-imp13-AH109.....	39
3.1.1.3 Grow-curve mensurate the toxicity of pGBKT7-C-imp13.....	40
3.1.1.4 self-excitation assay.....	40
3.1.1.5Screen human fetal brain cDNA library.....	41
3.2 experiment validate the interaction in vivo and in vitro.....	45
3. 2.1 co-immunoprecipitation assay validate the interaction.....	45
3. 2.2 GST-PULL DOWN assays validate the interaction.....	46
3.3 Preparation and purification of antibody of Arx.....	47
3. 3.1 Construct the recombination pGEX4T2-F-Arx, pET28 (a+) -F-ARX plasmid.....	47
3. 3.1.1Amplification F-Arx DNA fragment.....	47
3.3.1.2 Construct the recombination pGEX4T2-F-Arx, pET28 (a+) -F-ARX plasmid.....	48
3.3.1.3Expression and purification pGEX4T2-F-Arx, expression pET28 (a+) - F-ARX.....	49
3.3.2 Purification of The antiserum.....	51
4. Disscussion.....	53
References.....	55
Acknowledgements.....	59
Appendix.....	60

摘 要

生物大分子的核质转运是由受体 importin β 蛋白家族成员介导完成的。importin 13(imp13, 或者 Igl2、IPO13)是 importin β 蛋白家族的一个成员, 它的表达和功能是受发育调节。Northern Blot 和免疫组化实验均表明 IPO13 在脑的表达水平比其他组织都高。imp13 是目前所知的哺乳动物细胞中唯一具有双向转运功能的受体蛋白。

为了进一步研究 imp13 的功能, 在本研究中, 我们用羧基末端 imp 13 (amino acid 307-963) (C-imp13) 作为诱饵蛋白, 用酵母双杂交系统筛选人胚胎脑 cDNA 文库中能够与其相互作用的蛋白, 发现 Arx 蛋白质能与羧基末端 imp 13 相互作用。为了确定这个相互作用, 我们构建了能表达带有 GST 和 His₆ 标签的全长 Arx 的原核表达质粒。通过 GST pull-down 和免疫共沉淀实验, 我们发现, 像 C 端 Arx 与 imp13 相互作用一样, 全长 Arx 也能与 imp13 (外源和内源) 相互作用。由于 imp13 能够与 Arx 相互作用, 我们推测 Arx 有可能是 imp13 的入核底物。

Arx (Aristaless-related homeobox) 蛋白是成对同源结构域蛋白家族的一个成员。ARX 基因的突变和多种 X-连锁的疾病有关。研究发现 Arx 对前脑, 胰腺和睾丸的发育起重要作用。为了进一步研究 Arx 蛋白的功能, 我们构建了表达 Arx-GST 融合蛋白质的表达载体 pGEX4T2-F-Arx。F-Arx 蛋白纯化后做抗原, 免疫兔子, 血清经纯化和验证后, 获得了 Arx 多克隆抗体。

关键词: Arx; imp13; 相互作用;

ABSTRACT

Nucleocytoplasmic transport of macromolecules is mediated by soluble transport receptors, namely importin β superfamily proteins. Importin 13 (Imp13, also known as Igl2 、IPO13), is a member of the importin β superfamily, Its expression and function are developmentally regulated. Both Northern Blot analysis and microarray analysis show that the expression level is higher in the brain than in other tissues.

To study the function of imp13, we attempted to identify its interacting proteins from a human fetal brain cDNA library by Yeast Two-Hybrid screening using C-imp13 (amino acid 307-963) as the bait. We found that Arx protein can interact with C-imp13. To confirm this interaction, we expressed full-length of mouse Arx tagged with either His₆ or GST in bacteria. Like the interaction of the C-terminal Arx fragment with imp13, full-length Arx binds imp 13 as judged by GST-pull down assays. Equivalent observations were made by co-immunoprecipitation assays. Since both endogenous imp13 and overexpressed imp13 bind Arx, we suggest that Arx is an imp13 import cargo.

The Arx protein (Aristaless-related homeobox) is a member of the paired class of homeoproteins. ARX gene mutations are related with many X-chromosome linked disorders. Many research has indicated that it is crucial for its functions in forebrain, pancreases and testes development. To study the function of Arx protein, we construct a vector called pGEX4T2-F-Arx which can express the fused protein GST-Arx. By immunizing rabbits with the purified recombinant protein, antiserum was obtain. After purification and verification, we gain the polyclonal antibody of Arx.

Key words: Arx; imp 13; interaction; antibody

1.前言

1.1 蛋白质入核机制的研究

1.1.1 大分子物质核质转运的基本过程

蛋白质等生物大分子的核质分配，如核糖体蛋白，转录因子的入核转运,RNA分子及RNP颗粒的出核转运,主要是受到由核质转运受体蛋白质家族成员（主要是importin β 家族）介导的与核孔复合体的相互作用的调控完成的。入核转运的基本过程包括发生在细胞质中的底物-细胞核输入受体二聚体的形成、细胞核输入受体二聚体和核孔复合体的相互作用（如与FG-repeat的相互作用），发生在核内的RanGTP的作用下的“核输入受体-底物”二聚体的解聚和底物的释放，以及随后的“核输入受体-RanGTP”复合物通过NPC重返细胞质，并在胞质内RanGTP水解为RanGDP，使得核输入受体在胞质中被释放，开始新一轮的入核转运^[1,2](图1.1)

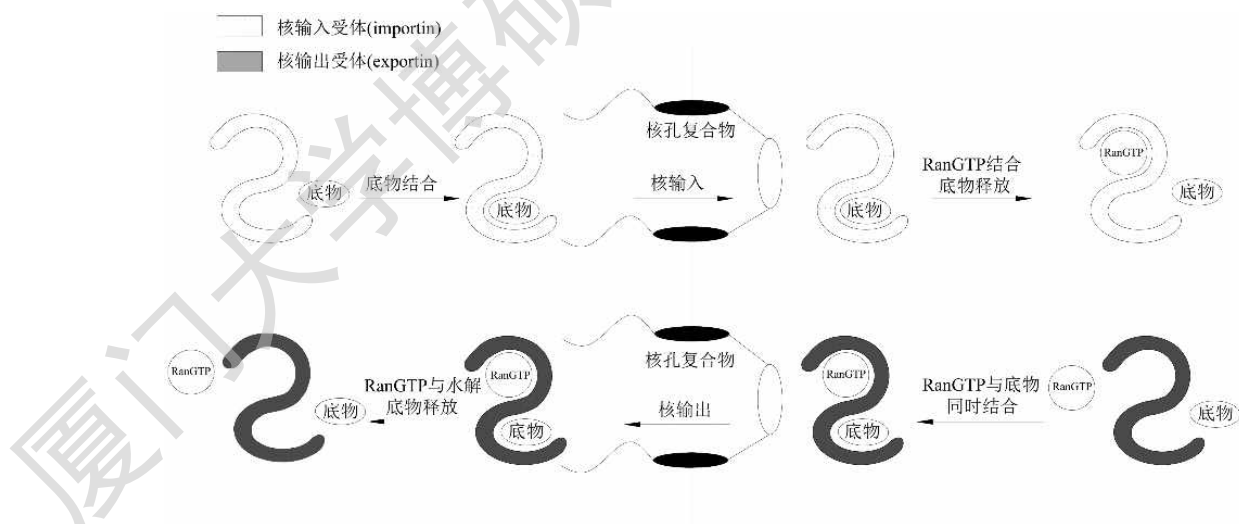


图1.1 细胞核质转运示意图

Fig 1.1 Scheme of nucleocytoplasmic transport mediated by transportin

资料来源：王潇等,细胞生物学杂志, 2006, 28: 637-645

Importin β 家族成员是一类真核生物中广泛分布的核质转运受体蛋白。迄今为止,在人类细胞中发现超过 20 个成员,酵母细胞中大约 14 个^[76]。这些家族成员在功能上保守,在蛋白质序列上具有较低的相似性;分子量大约 95-145 kDa 之间;结构上都具有保守的 N 端 Ran 结合结构域 (IBN_N Domain) 和多个 (~20) HEAT Repeats 结构域 (Swiss-Prot 数据库)。HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A and TOR1) 是由连续重复的 37-46 个氨基酸组成的一种螺旋形棒状结构单元。而 HEAT Repeats 由多个这样的单元叠加形成具有延展性的超螺旋,可以通过构象改变为相互作用的蛋白质提供丰富的结合位点。通过这种特殊的结构,importin β 家族成员可以使用 C 端结合底物(cargo)^[3] 或接头蛋白(adaptor)^[4], N 端结合 RanGTP^[5], 中部结合核孔蛋白(Nups)^[6], 从而将底物带入或带出细胞核。

1.1.2 importin13 的结构与功能的介绍

在研究肺器官发育的分子机理时,加拿大 McGill 大学 Kaplan 实验室得到长度为 3.6kb cDNA IPO13 (imp13, IPO13, Kap13) (Genbank, AF110195) 编码 963 个氨基酸的蛋白质^[7]。IPO13 定位在染色体 1p33-34.2 上。通过 BLAST 检索工具在网上数据搜索 imp13 序列的同源蛋白,发现 imp13 属于 Kap/imp β 家族成员,并且与之序列同源性最高的是 TRN-SR,即人类的 transportin 3 蛋白,与人类的酿酒酵母的 Mtr10 蛋白同源性次之。不仅序列相似,imp13 蛋白的其他特性也与 importin β 家族成员相同。

imp13 作为 importin β 家族成员,转运蛋白质进出细胞核是其重要的生物学功能。关于 imp13 的转运底物的报道近年来不断涌现,imp13 的转运特性也逐渐为人所知,有文献报道 Pax6 (paired homeodomain transcription factor Pax6) 由 Karyopherin β 家族成员 Kap13(imp13)转运入核^[8]。PAX 基因是一个编码转录因子的发育控制基因的超家族,也是一类进化上高度保守的基因家族,普遍存在于从果蝇到人类的各种动物体内,基因家族成员都包含 128 个氨基酸的成对结构域,并通过这个结构使蛋白与 DNA 结合。有文献报道在酵母双杂交中 Pax6 被认为是 imp13 的识别底物。体外 GST-pull down 和体内的免疫共沉淀都验证了 Pax6 和 imp13 之间的直接相互作用,洋地黄皂苷通透细胞膜试验证明了 Pax6 是依赖 Ran 由 imp13 转运入核。imp13 通过 NLS 识别 Pax6,这个 NLS

存在于包含同源结构域的 80 个氨基酸残基中。当这个同源序列的两端(aa208-214 和 aa 261-267)缺失后 imp13 和 Pax6 之间的作用力减弱。成对同源家族有 20 多个成员,所有成员都包含类似于 Pax6 的 NLS,因此都有可能被 imp13 转运入核。实验也证明了同一家族成员 Pax3,Crx 都能被 imp13 识别并被其转运入核^[8]。

有文献相继报道 imp13 是 SUMO-1/sentrin 连接酶 Ubc9 的入核转运受体,除此之外 imp13 也是 mgn(果蝇胚胎发育重要蛋白 mago nashi 的人类同源蛋白)和 Rbm8 (mgn 和 mRNA 之间的桥接蛋白)的入核转运受体,并且 imp13 与 Rbm8-Mgn 二聚体中的 Rbm8 直接作用,而且还发现 imp13 是转录起始因子 eIF1A 的核输出受体^{[17][51]}。Ubc9 和 Rbm8 都不含经典的入核序列(NLS),Rbm8 序列中含有两段富含带电荷的氨基酸基序,但它们相距 100 个氨基酸,所以无法形成经典 NLS 序列。推测这些氨基酸序列的三维结构可能形成类似于 NLS 的序列,或者这些蛋白可能结合于 imp13 的不同位点上^[9]。

还有人报道 imp13 可以介导转录激活因子 NF-Y 的二个亚基 NF-YB 与 NF-YC 形成的二聚体转运入核。NF-Y 由 NF-A, NF-YB 和 NF-YC 组成的异源三聚体,NF-A 可以直接结合 importin β 而被转运入核,而 NF-YB 和 NF-YC 都不能以单体的形式进行核输入,只有通过其保守的组蛋白折叠结构域(HFM)形成二聚体,才能被 imp13 识别并转运入核。这是由于单体的 NF-YB 或 NF-YC 的 HFM 结构域都不具有 NLS 的信号功能,核定位信号只出现在二个相互作用的 HFM 结构域中,因此 imp13 只能结合 NF-YB/NF-YC 二聚体并介导其入核^[10]。

最近,Tao等通过GST pull-down和CO-IP发现了imp13与GR(糖皮质激素受体)相互作用^[11],同时还发现IPO13 siRNAs抑制imp13的表达,直接导致GR蛋白质不能在糖皮质激素诱导下,进入细胞核,影响GR的正常生物学功能。他们发现将GR的NLS突变后(将513-515氨基酸中的赖氨酸用天冬酰胺替换),GR不能与importin α 结合^{[12][13]},但依然能与imp13相互作用。

已知目前有报道的 imp13 入核底物有: SUMO-1 连接酶 hUBC9、RNA 结合模体蛋白 Rbm8 和 Mgn 复合物^{[14][15]}、调控发育因子 Pax3、Pax6^[16], 转录激活因子 NF-YB/NF-YC 二聚体^[17], 糖皮质激素受体 GR^[18], myopodin^[19]出核底物有: 翻译启动因子 eIF1A^[14]。

Myopodin是我们研究imp13在心脏中的功能时发现的。我们利用大鼠imp13

作为诱饵蛋白在人心脏cDNA文库中筛选与其相互作用的蛋白质时发现 myopodin C端氨基酸360—698能与imp13相互作用。myopodin是一个富含脯氨酸与肌动蛋白微丝偶联的蛋白质，它在细胞中的核质分布情况受到细胞分化情况及胁迫的影响，同时它的表达与核质分布情况影响到膀胱癌及前列腺癌的恶化情况。我们利用GST—pull down实验和免疫共沉淀实验发现全长的myopodin能与imp13相互作用，同时我们检测到imp13与myopodin的相互作用受到RanGTP的调节。在293T细胞中，我们发现C端片段的imp13能阻止myopodin入核，在NIH3T3细胞中，imp13的siRNA同样阻止myopodin入核。因此我们推断imp13能将myopodin带入核。

1.2 Arx的研究进展

1.2.1 ARX基因和Arx蛋白

1.2.1.1 ARX基因的发现

ARX 基因定位于 X 染色体上^[20]，在脊椎动物中，它首先于 1997 年报道表达于老鼠的中枢神经系统中^[21]。由于它和果蝇 *aristaless* 基因相似度很高，故而命名为 Arx (Aristaless-related homeobox)。2002 年才发现人源 ARX 基因^[22,23]，并发现其功能紊乱与人类各种 X 连锁的智力发育迟缓症和癫痫症有关。通过同源比较分析发现，人类的 ARX 与鼠的 ARX 在氨基酸水平上具有 95% 的同源性。ARX 属于 *Aristaless* 相关基因家族，是成对同源异型结构基因中的一份子。这些基因被认为是脊椎动物胚胎发生期的重要调节子，包括中枢和外周神经系统的发育^[24]。研究发现 ARX 对前脑，胰腺和睾丸的发育起重要作用。

1.2.1.2 ARX基因

ARX基因定位于Xp22,邻近于POLA(DNA多聚酶 I ,DNA Polymerase I) 基因。它是一个长约12.5kb的小基因，有5个外显子(图1.2)。除了在脑和骨骼肌中有一个约2.8kb的转录本之外^[22]，Northern blot实验结果证实心脏内存在较长的转录本(约4.4kb和约5.9kb)^[23, 25]。而在骨骼肌中存在较短的转录本(约2.5kb和2.1kb)^[22]。然而，应用EST和它的同源性分析其基因结构表明ARX编码区的可变剪切可能并不存在。这些不同的转录本可能是由于PolyA的长度变化以及

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库